

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. September 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/085799 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 1/28**, 1/36

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000982

(22) Internationales Anmeldedatum:  
1. Februar 2005 (01.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
04005103.9 4. März 2004 (04.03.2004) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HAUKE, Guenter** [DE/DE]; Im Seegraben 11, 64367 Muehltal (DE). **GRABIS, Daniela** [DE/DE]; Sternallee 89, 68723 Schwetzingen (DE). **BEIRAU, Andreas** [DE/DE]; Bert-Brecht-Strasse 20, 64291 Darmstadt (DE). **ALLMANN, Heinz** [DE/DE]; Odenwaldstrasse 67, 64397 Modautal (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MEANS FOR COVERING MICROSCOPIC PREPARATIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUM EINDECKEN VON MIKROSKOPISCHEN PRÄPARATEN

**(57) Abstract:** The invention relates to covering glasses which are coated with a covering medium and which are used to cover preparations and to mechanical methods for the production thereof. The inventive covering glasses make it significantly easier to cover preparations by virtue of the fact that it is not necessary to handle the glutinous covering medium and the fact that the preparations can be firmly covered in just a few minutes and can be microscoped using immersion lenses. The layer thicknesses and layer thickness tolerances according to the invention result in a stable and lasting covering.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft mit Eideckmedium beschichtete Deckgläser zum Eidecken von Präparaten sowie maschinelle Verfahren zu deren Herstellung. Durch die erfindungsgemäßen Deckgläser wird das Eidecken von Präparaten stark vereinfacht, da zum einen die Handhabung des klebrigen Eideckmediums entfällt und zum anderen die Präparate schon nach wenigen Minuten fest eingedeckt sind und selbst unter Verwendung von Immersionsobjektiven mikroskopiert werden können. Durch die erfindungsgemäßen Schichtdicken und Schichtdickentoleranzen des Eideckmediums wird eine stabile und dauerhafte Eideckung erzeugt.

**WO 2005/085799 A1**

**Mittel zum Eindecken von mikroskopischen Präparaten**

Die Erfindung betrifft mit Eindeckmedium beschichtete Deckgläser, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung bei der 5 manuellen und automatischen Eindeckung von mikroskopischen Präparaten.

Die mikroskopische Untersuchung von Präparaten in der Durchlichttechnik beruht auf der Lichtbrechung an sehr dünnen Objekten. Dazu werden die 10 Präparate zunächst auf einen Objektträger aufgezogen, mit Reagenzien, wie Färbereagenzien oder Entwässerungsmitteln, behandelt und anschließend mit einem glasähnlichen Harz fest umgeben. Dies geschieht durch Einbettung oder Infiltration von Harzen in die Proben. Diese Harze, auch Eindeckmedien genannt, durchdringen den dünnen Schnitt des 15 Untersuchungsmaterials und verbinden sich idealerweise ohne Phasenbrechung mit dem Objektträger unter dem Material und dem Deckglas über dem Material. Man erhält so ein in eine Glasphase eingebettetes Präparat, das sich gut für die Untersuchung im Durchlichtmikroskop eignet und zugleich konserviert ist.

20 Als bevorzugtes Material für Objektträger und Deckgläser wird im allgemeinen Glas verwendet. Es ist jedoch beispielsweise auch möglich, statt eines Deckglases zum Abdecken der Präparate eine Kunststofffolie oder Deckgläser aus Kunststoff zu verwenden. Diese Materialien haben 25 jedoch im Gegensatz zu Glas den Nachteil, daß sie nicht vollständig undurchlässig für Lösungsmittel sind. Die eingedeckten Präparate altern schneller und die Deckfolie kann sich ablösen.

30 Die Eindeckung von Präparaten kann in hydrophobe oder hydrophile Eindeckmedien erfolgen.

Zur Eindeckung in hydrophobe Medien muß das Präparat, nachdem es auf den Objekträger aufgezogen und gefärbt wurde, zunächst entwässert werden. Dazu wird es über eine aufsteigende Alkoholreihe schließlich in Xylol oder einen Xylolersatzstoff eingebracht. Anschließend wird der

5 Objekträger mit dem hydrophoben Eindeckmedium versehen und das Deckglas so aufgelegt, daß keine Luftblasen im Präparat entstehen. Nach Aushärtung des Eindeckmediums ist das Präparat in einer glasähnlichen Umgebung luftdicht eingeschlossen und kann im Durchlichtmikroskop untersucht werden.

10 Zur Eindeckung in hydrophile Eindeckmedien muß die Probe nicht entwässert werden, sondern kann sofort mit dem Eindeckmedium versehen werden. Nach Abdeckung mit dem Deckglas und Aushärtung des Eindeckmediums ist das Präparat wie bei Verwendung eines hydrophoben

15 Eindeckmediums in einer glasähnlichen Umgebung luftdicht eingeschlossen und kann im Durchlichtmikroskop untersucht werden.

Das Eindecken der Präparate ist ein sehr aufwendiger und zeitintensiver Schritt. Wird das Eindeckmedium manuell auf den Objekträger aufgebracht,

20 muß darauf geachtet werden, daß stets eine gleichbleibende Menge aufgegeben wird, da sonst das Medium seitlich austritt und verklebt, oder aber die Eindeckung nicht vollständig ist. Auch bei der Verwendung von Eindeckautomaten treten häufig Störungen auf, da austretendes Eindeckmedium den Automaten verklebt. Werden die eingedeckten

25 Präparate zu schnell nach dem Eindecken gestapelt oder eng gelagert, können sie auch untereinander oder mit ihrer Umgebung verkleben.

Weiterhin benötigt das Eindeckmedium bis zur Aushärtung Trocknungszeiten von mindestens 30 Minuten, bei hydrophilen Medien sogar mehr als

30 45 Minuten. Auf diese Weise müssen lange Wartezeiten in Kauf genommen werden, bevor das eingebettete Präparat unter dem Mikroskop untersucht werden kann. Dies gilt insbesondere für Untersuchungen mit Immersions-

objektiven. Der große Zeitbedarf ist zudem besonders bei Schnellschnitten, die beispielsweise während einer Operation entnommen werden und sofort untersucht werden müssen, ein großer Nachteil.

5 US 3,498,860 und EP 1242800 offenbaren den Einsatz von Deckgläsern, die bereits vorher mit Eindeckmedium oder Klebstoff beschichtet wurden. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das Deckglas vorher mit dem Eindeckmedium beschichtet, getrocknet und bis zum Einsatz gelagert werden kann. Die Arbeit mit flüssigen Eindeckmedien während des 10 Eindeckens entfällt. Auch die Trockenzeiten werden stark verkürzt. Trotzdem fand das in US 3,498,860 und EP 1242800 offenbarte Verfahren keine Anwendung in der Praxis, da die beschichteten Deckgläser nur mäßige Hafteigenschaften zeigten und sich häufig nach kurzer Zeit wieder ablösten.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, mit Eindeckmedium beschichtete Deckgläser bereitzustellen, die die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Es wurde gefunden, dass mit Eindeckmedium beschichtete Deckgläser mit 20 sehr guten Hafteigenschaften und langer Lebensdauer hergestellt werden können, wenn die Schicht des Eindeckmediums zwischen 0,05 und 0,8 mm beträgt und die Schichtdickentoleranz nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm, bevorzugt nicht mehr als  $\pm 0,05$  mm beträgt. Beschichtungen mit diesen 25 Eigenschaften können manuell nicht zuverlässig erzeugt werden. Es wurde jedoch gefunden, dass maschinelle Verfahren die Herstellung der Deckgläser mit der gewünschten Beschichtung ermöglichen.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Mittel zum Eindecken von 30 Präparaten, das im wesentlichen aus einem Deckglas und einer darauf aufgebrachten Schicht eines Eindeckmediums besteht, dadurch gekennzeichnet, dass die Schichtdicke des Eindeckmediums zwischen

0,05 und 0,8 mm und die Schichtdickentoleranz nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm beträgt.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Schichtdickentoleranz nicht mehr als  $\pm 0,05$  mm.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Schichtdicke des Eindeckmediums ca. 0,2 mm.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Deckglas aus Glas.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt der Feststoffanteil des Eindeckmediums in getrocknetem Zustand auf einer Fläche von 24 x 50 mm 150 – 300 mg.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Verfahren zur Herstellung von mit Eindeckmedium beschichteten Deckgläsern, dadurch gekennzeichnet, dass das Eindeckmedium maschinell mittels einer oder mehrerer Dosiernadeln, mittels Druckverfahren, Beschichtung durch einen 20 Flüssigkeitsvorhang, Auftrag durch eine Schlitzdüse, Verteilen mit einem Rakel oder mittels Spin Coating mit einer Schichtdicke zwischen 0,05 und 0,8 mm und einer Schichtdickentoleranz von nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm auf das Deckglas aufgetragen wird.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Auftrag des Eindeckmediums mittels einer oder mehrerer Dosiernadeln.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Auftrag des Eindeckmediums mittels Siebdruck.

30

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen mit Eindeckmedium beschichteten Deckglases zur manuellen oder automatischen Eindeckung von Präparaten.

5 Erfindungsgemäß bedeutet Eindecken von Präparaten das Bereitstellen eines Objektträgers, auf dem sich ein aufgezogenes, optional gefärbtes, mit Intermedium benetztes Präparat befindet sowie eines erfindungsgemäß beschichteten Deckglases und das anschließende Abdecken des Objektträgers mit dem Deckglas. Als Intermedium wird bei Eindeckung mit hydrophoben Eindeckmedien das letzte Lösungsmittel der Entwässerungsreihe bzw. der Färbung, d.h. typischerweise Xylol oder Xylolersatzstoffe, bei Eindeckung mit hydrophilen Eindeckmedien typischerweise Wasser bezeichnet. In diesen Lösungsmitteln können die Präparate über einen längeren Zeitraum bis zur Eindeckung gelagert werden.

10 15 Durch das erfindungsgemäße Deckglas wird das Eindecken von Präparaten stark vereinfacht. Während zum Eindecken nach dem Stand der Technik drei Komponenten, d.h. der Objektträger mit dem aufgezogenen Präparat, das flüssige Eindeckmedium und das Deckglas, 20 zusammengeführt werden müssen, wird das Verfahren erfindungsgemäß auf zwei leicht handhabbare Komponenten, d.h. den Objektträger mit dem aufgezogenen, mit Intermedium befeuchteten Präparat und das beschichtete Deckglas, reduziert.

25 Unter den Begriff Deckglas fallen erfindungsgemäß alle für den Zweck bekannten und geeigneten Deckgläser, wie z.B. Deckgläser aus Glas oder Kunststoff oder auch Folien. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Deckgläser aus Glas. Diese werden in Abhängigkeit ihrer Größe bevorzugt auf einer Seite mit einer definierten Menge des flüssigen Eindeckmediums 30 versehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Seite wird eine Seite eines Deckglases komplett mit einer Schicht

eines Eindeckmediums versehen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Schicht das Deckglas nicht komplett bedeckt, sondern die Randbereiche frei lässt. Wichtig ist insbesondere, dass das Deckglas an den Stellen mit der erfindungsgemäßen Schicht des Eindeckmediums bedeckt ist, an

5 denen sich das zu mikroskopierende Präparat befindet. Dabei muss die Schicht des Eindeckmediums um soviel größer sein als die Fläche des Präparats, dass sie an allen Seiten über das Präparat hinausgeht und so eine feste Bindung mit dem Objektträger zustande kommt, auf dem sich das Präparat befindet.

10 Als Eindeckmedium zur Beschichtung der Deckgläser können alle typischerweise zum Eindecken nach dem Stand der Technik verwendeten Eindeckmedien eingesetzt werden. Die Beschichtung kann sowohl mit hydrophoben als auch mit hydrophilen Eindeckmedien erfolgen. Dies sind

15 beispielsweise Eindeckmedien auf Basis von organischen Polymeren, wie Kanadabalsam, Acrylatharzen, z.B. Polymethacrylat, Polystyrol, Polyvinyl-pyrrolidon, Polyvinylalkohol oder Glyceringelatine. Typischerweise enthalten derartige Eindeckmedien Lösungsmittel, wie Wasser, Xylool oder Xyloolersatzstoffe, wie Toluol, oder andere aromatische oder aliphatische

20 Kohlenwasserstoffe, sowie weitere Zusatzstoffe, die dem Fachmann bekannt sind. Weitere Beispiele für Eindeckmedien finden sich in „Romeis - Mikroskopische Technik“, Urban & Schwarzenberg, 17. Auflage, 1989, Seite 296-297.

25 Es wurde gefunden, dass der Feststoffanteil der Eindeckmedien zur Beschichtung der Deckgläser ca. 40 % oder mehr betragen sollte. Dieser Wert ist jedoch nur als Richtwert, nicht aber als Absolutwert aufzufassen. In Abhängigkeit der jeweiligen Feststoffkomponente, der Oberflächen- spannung und der Viskosität des Eindeckmediums kann sich dieser Wert

30 ändern. Der Fachmann auf dem Gebiet des Eindeckens ist mit diesem Richtwert nach wenigen Beschichtungs- und Eindecktests in der Lage zu

beurteilen, welcher Feststoffanteil bzw. welches Volumen Eindeckmedium pro mm<sup>2</sup> Deckglas für das jeweilige Eindeckmedium sinnvoll ist.

Die Viskosität der handelsüblichen Eindeckmedien kann vor deren  
5 Verwendung durch Abdampfen eines Teils des Lösungsmittels erhöht werden, so daß der Feststoffanteil steigt. Als besonders geeignet haben sich Eindeckmedien mit einer Viskosität zwischen 2000 und 4000 mPas erwiesen. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz von Eindeckmedien mit einer Viskosität um 3000 mPas. Eine Verarbeitung höherviskoser Medien  
10 ist bei der zu erzielenden Schichtdicke und Schichtdickentoleranz schlecht möglich.

Der Feststoffanteil des Eindeckmediums sollte in getrocknetem Zustand zwischen 150 und 300 mg auf einer Fläche von 24 x 50 mm betragen.  
15 Bevorzugt werden ca. 200 mg auf eine Fläche von 24 x 50 mm aufgetragen. Ist der Feststoffanteil höher, besteht die Gefahr, dass die Schichtdicke so groß ist, dass das Lösungsmittel beim Eindecken nicht bzw. nicht schnell genug die Schicht durchdringt und es dann zu keiner Verklebung von Objektträger und Deckglas kommt.  
20 Wenn zu wenig aufgebracht wird, ist die Polymeremasche nicht ausreichend, und die Funktionalität ist nicht gewährleistet.

Es wurde gefunden, dass eine für eine stabile und dauerhafte Eindeckung kritische Größe der beschichteten Deckgläser insbesondere die  
25 Schichtdicke des Eindeckmediums und die Schichtdickentoleranz ist. Schwankt die Schichtdicke über eine Toleranz von  $\pm 0,1$  mm so löst sich häufig schon nach kurzer Zeit das Deckglas an einigen Stellen vom Präparat ab. Dadurch altert das Präparat vorzeitig und kann nicht mehr mikroskopisch untersucht werden. Eine optimale Lagerstabilität und  
30 Haltbarkeit zeigte sich bei Beschichtungen mit einer Dicke zwischen 0,05 und 0,8 mm, bevorzugt zwischen 0,1 und 0,4 mm, und einer Schichtdickentoleranz von nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm, bevorzugt nicht mehr

als  $\pm 0,05$  mm, besonders bevorzugt nicht mehr als  $\pm 0,02$  mm. Eine derartige Beschichtung kann nur schwer und nicht zuverlässig von Hand aufgetragen werden. Es wurde jedoch gefunden, dass sich verschiedene maschinelle Verfahren gut für den gleichmäßigen Auftrag des  
5 Eindeckmediums auf die Deckgläser eignen:

#### **Auftrag mittels Dosiernadel(n)**

Besonders bevorzugt ist der Auftrag mittels einer oder mehrerer Dosiernadeln. Mit diesem Verfahren ist eine vollflächige wie auch  
10 teilflächige Beschichtung der zu beschichtenden Werkstoffe möglich. Das Eindeckmedium wird in einem Behältnis vorgelegt und z.B. mit Hilfe einer Dosierpumpe, Druckluft, Flüssigkeitsdruck oder durch einen Kolben über eine oder mehrere Dosiernadeln auf das Deckglas aufgebracht. Die  
15 Beschichtung erfolgt, indem sich die Dosiernadel und/oder das Deckglas bzw. die Vorlage mit dem Deckglas in x und y Richtung bewegt. Die entsprechende homogene Oberfläche und Schichtdicke kann über die Geschwindigkeit der Bewegung der Nadel bzw. des Deckglases in x/y-Richtung und/oder über den Mengendurchsatz aus der Nadel gesteuert werden.  
20 Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das Eindeckmedium vorher in bezug auf die Viskosität genau eingestellt werden kann und bis zum Austrag in einem geschlossenen System verbleibt (keine Viskositätsänderung während des Beschichtungsprozesses).  
Der Durchmesser der Dosiernadel beträgt typischerweise zwischen 0,25  
25 und 7,5 mm, bevorzugt ca. 0,8 mm. Zu beachten ist, dass der Abstand zwischen Nadel und Deckglas unter sehr engen Toleranzen erfolgen muss – entsprechend den Toleranzen der Schichtdicke. Der Abstand der Dosiernadel zum Deckglas sollte der gewünschten Schichtdicke des  
30 Eindeckmediums entsprechen. Durch die Geschwindigkeit der Dosiernadel, die Abstände der einzelnen Beschichtungslinien, den Volumenstrom des Eindeckmediums und die Viskosität des Eindeckmediums lässt sich für jedes Eindeckmedium die Beschichtung optimieren.

Bei Bedarf können die Nadel und/oder das Eindeckmedium temperiert werden.

### Druckverfahren

5

Zum Beschichten der Deckgläser, Folien und Platten eignen sich auch drucktechnische Verfahren. Die wichtigsten hierfür sind:

Tampondruck

Offsetdruck

10

Tiefdruck

Siebdruck

Inkjet

15

Als davon besonders geeignetes Verfahren hat sich das Siebdruckverfahren herausgestellt.

20

Hier ist es möglich mit hochviskosen Eindeckmedien zu arbeiten und damit definierte Schichtdicken aufzutragen. Außerdem kann man das Sieb so gestalten, dass nur die gewünschten Flächen beschichtet werden. Um eine große Stückzahl und eine gute Auslastung der großformatigen Maschinen zu gewährleisten, müssen die Deckgläser in einen Carrier eingelegt werden. Dieser kann viele Plättchen aufnehmen. Er muss so gestaltet werden, dass Kavitäten vorgesehen sind, in welche die Deckgläser genau hineinpassen, so dass eine ebene Fläche für den Druck gegeben ist. Da beim Drucken hohe Kräfte auftreten, werden die Deckgläser bevorzugt mit Vakuum - Unterstützung fixiert.

25

Das Eindeckmittel wird dann auf das Sieb gegeben und anschließend der Druckvorgang gestartet.

30

Typischerweise verteilt ein Füllrakel das Medium auf dem ganzen Sieb.

Anschließend fährt das Druckrakel darüber. Dieses drückt das gefüllte Sieb, welches einen Abstand von einigen Millimetern zu den Deckgläsern

hat, auf diese. Hierdurch wird das Eindeckmittel auf die Deckgläser gedruckt.

Die Schichtdicke hängt ausschließlich vom verwendeten Sieb ab. Dabei müssen die offene Maschenweite und der Fadendurchmesser des Siebs an das jeweilige Eindeckmedium, insbesondere an dessen Viskosität, angepasst werden. In der Regel eignen sich Siebe mit Maschenweiten zwischen 300 und 1500  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 500 und 1000  $\mu\text{m}$ , und Fadendurchmesser zwischen 100 und 500  $\mu\text{m}$ . Beispielsweise wurde bei einem Eindeckmedium mit einer Viskosität von 2900 mPas mit einem Sieb mit einer Maschenweite von 688  $\mu\text{m}$  und einem Fadendurchmesser von 140  $\mu\text{m}$  eine feuchte Schichtdicke von 200  $\mu\text{m}$  erreicht. Durch das Trocknen wird die Schichtdicke dann noch etwas kleiner. Häufig ist es, insbesondere bei Eindeckmedien mit relativ niedriger Viskosität, vorteilhaft, nicht nur eine Siebdruckbeschichtung vorzunehmen, sondern zwei oder mehrere, z.B. mit einem Karussellsiebdruckverfahren.

Nach dem Drucken wird der Carrier mit den Deckgläsern entnommen und ein neuer Vorgang kann vorbereitet werden.

### **Beschichtung durch einen Flüssigkeitsvorhang**

Die Deckgläser werden unter einem Flüssigkeitsvorhang hindurchgeschoben. Durch die Geschwindigkeit der Gläser und den Volumenstrom des Eindeckmediums wird die Schichtdicke festgelegt.

Für dieses Verfahren muss das Eindeckmedium sehr stark verdünnt werden, um ein gleichmäßiges Fließen zu gewährleisten. Dadurch kann es vorteilhaft sein, mehrere Beschichtungsdurchgänge durchzuführen.

Die Vorteile dieses Verfahrens bestehen in der auf diese Weise erzielbare besonders gleichmäßige Oberfläche.

**Auftragen durch eine Schlitzdüse**

Bei diesem Verfahren wird das Eindeckmedium mit Druck durch eine  
5       Schlitzdüse gepresst, die genau die Breite der Deckgläser hat. Durch  
bewegen der Düse wird die gesamte Fläche abgefahren und somit das  
Medium auf das Glas gebracht.

Die Düse kann sowohl so ausgeführt sein, dass das Medium aus der Düse  
direkt auf das Glas gebracht wird, als auch so, dass das Medium durch  
10      eine Vorrichtung nach dem Auftreffen auf der Glasoberfläche verstrichen  
wird.

**Punktuelles Auftragen des Eindeckmediums und Verteilen mit einem  
Schieber (Rakeln)**

15      Das Eindeckmedium wird, analog zum manuellen Verfahren, an einem  
Punkt auf das Deckglas gegeben. Anschließend wird es mit einem  
Schieber, einem sogenannten Rakel, verteilt. Hierbei kann es sich um  
einen Spiralrakel handeln, der direkt auf der Glasoberfläche geführt wird,  
20      oder eine Platte, welche in dem Abstand geführt wird, dem die gewünschte  
Schichtdicke entspricht.

Bei diesem Verfahren ist eine genaue Schichtdicke gut zu erreichen.  
Jedoch wird etwas Eindeckmedium immer seitlich weggedrückt. Daher ist  
zum Beschichten ein Carrier nötig, in den die Deckgläser eingelegt werden.  
25      Auch dieser muss nach jedem Beschichtungsdurchgang gereinigt werden.  
Außerdem müssen die Plättchen immer zum Trocknen vom Carrier  
getrennt werden, da sie nach Aushärtung des Mediums nicht mehr zu lösen  
sind.

### Spin Coating

Bei diesem Verfahren rotiert das zu beschichtende Deckglas. Das Eindeckmedium wird tropfenförmig aufgegeben und verteilt sich durch die Fliehkraft.

Da immer etwas Medium die Oberfläche des Glases verlässt, ist hier eine ständige Reinigung des Spin Coating Maschine nötig, da sonst ein Verschmutzen und Festkleben der Gläser nicht ausgeschlossen werden kann.

In der Regel schließt sich bei jedem der genannten Verfahren nach dem Auftrag des Eindeckmediums ein Trocknungsschritt an. Sollen die beschichteten Deckgläser sofort eingesetzt werden, reicht eine Trockenzeit von 1 bis 5 Minuten, bevorzugt bei leicht erhöhter Temperatur im Trockenschrank. Zu hohe Temperaturen, d.h. Temperaturen über 60-80°C, sind für viele Eindeckmedien nicht geeignet, da das Polymer angegriffen wird und Risse in der Beschichtung auftreten können.

Sollen die Deckgläser gelagert und dafür gegebenenfalls auch direkt aufeinander gestapelt werden, dann sind längere Trocknungszeiten bis 24 Stunden vorteilhaft. Als gut geeignet haben sich z.B. 2 Stunden bei 60°C im Trockenschrank erwiesen.

Zur Eindeckung wird das beschichtete Deckglas mit der beschichteten Seite auf einen durch Intermedium noch feuchten Objektträger mit bekannter Technik aufgelegt. Durch die Beschichtung mit dem Eindeckmedium verbinden sich Deckglas und Objektträger innerhalb weniger Sekunden und härten aus. Typischerweise ist das Präparat bereits nach 3 Minuten, meistens sogar nach weniger als einer Minute, vollständig ausgehärtet und kann dann, z.B. unter Verwendung von Immersions-objektiven, mikroskopiert werden.

5

10

15

20

25

30

Durch die einfache Handhabung eignet sich das erfindungsgemäße beschichtete Deckglas sowohl zur manuellen wie auch zur automatischen Eindeckung von Präparaten. Da zum Eindecken kein flüssiges Eindeckmedium verwendet werden muß, besteht keine Gefahr des Verklebens.

5 Bevorzugterweise werden die auf den Objektträgern fixierten Präparate direkt nach dem Färben und optional nach dem Entwässern aus der letzten Lösung (Intermedium), d.h. z.B. Wasser oder Xylol bzw. Xylofersatzstoffen, entnommen und in noch feuchtem Zustand eingedeckt. Sind die Präparate bereits nahezu trocken, sollten sie nochmals mit wenig Intermedium

10 angefeuchtet werden.

Ein weiterer Parameter, der zu beachten ist, ist die Art und Dicke der Präparate. Das erfindungsgemäße Deckglas eignet sich zum Eindecken von Präparaten beispielsweise aus Histologie und Zytologie, wie sie typischerweise auch nach dem Stand der Technik eingedeckt werden.

15 Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Deckgläser insbesondere zum Eindecken von Präparaten mit einer Dicke bis zu 15 µm. Je nach Dicke der Beschichtung des Deckglases und der Art des Eindeckmediums können auch dickere Präparate eingedeckt werden.

20 Neben der manuellen Eindeckung können die beschichteten Deckgläser und das erfindungsgemäße Verfahren auch für die automatische Eindeckung mit Eindeckautomaten verwendet werden. Eindeckautomaten, die nach dem Stand der Technik die Objektträger mit einer definierten Menge Eindeckmedium benetzen und anschließend das Deckglas

25 aufsetzen, sind kommerziell erhältlich. Für das erfindungsgemäße Eindeckverfahren können sowohl Eindeckautomaten nach dem Stand der Technik verwendet werden, deren Funktion leicht modifiziert wird, wie auch Eindeckautomaten, die für das erfindungsgemäße Verfahren konzipiert sind. Herkömmliche Eindeckautomaten besitzen eine Dosierpumpe, um flüssiges Eindeckmedium auf die Objektträger aufzubringen. Dies ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig. Demnach kann dieser

Schritt beim Einsatz von Eindeckautomaten für das erfindungsgemäße Verfahren ausgelassen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, über diese Dosiervorrichtung statt des Eindeckmediums etwas Intermedium (Wasser, Xylol, etc.) auf die Objektträger zu geben. Da die Objektträger mit den Präparaten für das erfindungsgemäße Verfahren noch feucht sein sollten, könnten Präparate, die nach dem Färben oder Entwässern bereits wieder leicht getrocknet sind, durch eine kleine Menge Intermedium erneut angefeuchtet werden. Anschließend wird das Präparat mit dem erfindungsgemäßen Deckglas eingedeckt.

In einer anderen Ausführungsform eines Eindeckautomaten, die besonders für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet ist, werden die Objektträger mit den Präparaten in einem mit Lösungsmittel (Intermedium) gefüllten Behälter gelagert. Erst zur Eindeckung werden die Objektträger aus dem Lösungsmittelbehälter heraus transportiert und direkt mit dem beschichteten Deckglas bedeckt. Die Aufgabe von Eindeckmedium oder weiterer Mengen an Lösungsmittel ist hier nicht notwendig.

Durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Deckglases werden die Eindeckautomaten wesentlich schonender behandelt als mit herkömmlichen Verfahren, da kein klebriges Eindeckmedium in den Automaten gelangen kann. Genau wie bei der manuellen Eindeckung können die Präparate schon nach kurzer Zeit mikroskopiert werden.

Somit bietet die erfindungsgemäßen Deckgläser und das erfindungsgemäße Verfahren zum Herstellen dieser Deckgläser nun die Möglichkeit, Präparate schnell und einfach einzudecken. Die manuelle Handhabung klebriger Eindeckmittel entfällt. Durch die erfindungsgemäße Schichtdicke und Schichtdickentoleranz des Eindeckmediums wird eine dauerhafte Eindeckung erzeugt. Die eingedeckten Präparate können über einen langen Zeitraum gelagert werden, ohne dass sich das Deckglas ablöst.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als 5 beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, insbesondere der 10 korrespondierenden Anmeldung EP 04005103.9, eingereicht am 04.03.2004, ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

15

20

25

30

**Beispiele****1. Beschichtung mittels Siebdruck**

Ein Sieb mit einer offenen Maschenweite von 688  $\mu\text{m}$  und einem  
5 Fadendurchmesser von 140  $\mu\text{m}$  wird auf einen Rahmen von 700\*500 mm  
gespannt und auf einem Flachbett-siebdruckautomat montiert.  
Auf einer Unterlage werden auf einem Träger 6\*7 Reihen Deckgläser 25\*50  
mm mittels Vakuum positioniert.  
Das Eindeckmedium mit einer Viskosität von 2900 mPas wird auf das Sieb  
10 aufgegeben, das Sieb über die Deckgläser abgesenkt und dann mit Hilfe  
eines Rakels das Eindeckmedium durch das Sieb auf die Deckgläser  
gedrückt.  
Sofort danach wird das Sieb wieder angehoben. Anschließend werden die  
Deckgläser zum Trocknen entnommen.

15

**2. Beschichtung mittels Dosiernadel**

Die Deckgläser (25x50 mm) werden mit Hilfe einer Vorrichtung auf einem  
Vakuumtisch positioniert.  
20 Der Durchmesser der Dosiernadel beträgt von 0,8 mm. Als Eindeckmedium  
wird Entellan<sup>®</sup> mit einer Viskosität von 2900mPas verwendet.  
Eine Spritze mit Dosiernadel wird gefüllt und mit einem Kolben  
verschlossen.  
Der Abstand zwischen Dosiernadel und Deckglas sollte der aufzutragenden  
25 Schichtdicke entsprechen (hier: 0,2 mm)  
Die Dosiernadel wird mit einem Dosierroboter über einem Deckglas  
positioniert. Der Spritzenkolben wird dann mit ca. 2 bar beaufschlagt und  
die Nadel mit einer Geschwindigkeit von 60-100mm/min verfahren.  
Es werden einzelne "Eindeckmedium-Raupen" als Z-Form aufgetragen.  
30 Mit dieser Fahrweise werden die Deckgläser einzeln beschichtet.

## Ansprüche

1. Mittel zum Eindecken von Präparaten, das im wesentlichen aus einem Deckglas und einer darauf aufgebrachten Schicht eines Eindeckmediums besteht, dadurch gekennzeichnet, dass die Schichtdicke des Eindeckmediums zwischen 0,05 und 0,8 mm und die Schichtdickentoleranz nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm beträgt.  
5
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Schichtdickentoleranz nicht mehr als  $\pm 0,05$  mm beträgt.  
10
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Schichtdicke des Eindeckmediums ca. 0,2 mm beträgt.  
15
4. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Deckglas aus Glas ist.  
20
5. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Feststoffanteil des Eindeckmediums in getrocknetem Zustand auf einer Fläche von 24 x 50 mm 150 – 300 mg beträgt.  
25
6. Verfahren zur Herstellung von mit Eindeckmedium beschichteten Deckgläsern, dadurch gekennzeichnet, dass das Eindeckmedium maschinell mittels einer oder mehrerer Dosiernadeln, mittels Druckverfahren, Beschichtung durch einen Flüssigkeitsvorhang, Auftrag durch eine Schlitzdüse, Verteilen mit einem Rakel oder mittels Spin Coating mit einer Schichtdicke zwischen 0,05 und 0,8 mm und einer Schichtdickentoleranz von nicht mehr als  $\pm 0,1$  mm auf das Deckglas aufgetragen wird.  
30

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Auftrag des Eindeckmediums mittels einer oder mehrerer Dosiernadeln erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Auftrag des Eindeckmediums mittels Siebdruck erfolgt.  
5
9. Verwendung eines Mittel zum Eindecken von Präparaten gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur manuellen oder automatischen Eindeckung von Präparaten.  
10
- 15
- 20
- 25
- 30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000982A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N1/28 G01N1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 589 650 B1 (GOVEK MICHAEL ET AL) 8 July 2003 (2003-07-08) abstract columns 2-4 column 5, lines 45-60 column 7, lines 28-60 ----- US 4 853 262 A (HORIE ET AL) 1 August 1989 (1989-08-01) column 2, lines 1-25 column 2, lines 67,68 column 3, lines 46-49 column 3, lines 57-69 example 1 ----- -/-	1-9
X		1-9

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2005

Date of mailing of the international search report

13/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Michalitsch, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000982

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 498 860 A (JOHN E.P. PICKETT) 3 March 1970 (1970-03-03) column 1, line 63 – column 2, line 15 column 2, lines 58-61 -----	1-9
X	US 4 302 480 A (FISCHER ET AL) 24 November 1981 (1981-11-24) abstract column 1, lines 40-54 column 3, lines 1-56 -----	1-9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 107 (P-563), 4 April 1987 (1987-04-04) & JP 61 254916 A (MITSUBISHI RAYON CO LTD), 12 November 1986 (1986-11-12) abstract -----	1-9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 22, 9 March 2001 (2001-03-09) & JP 2001 125006 A (MUTO KAGAKU KK), 11 May 2001 (2001-05-11) abstract -----	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/000982

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 6589650	B1	08-07-2003	AU	2939501 A	18-02-2002
			AU	8114101 A	18-02-2002
			AU	8120201 A	18-02-2002
			CN	1446370 A	01-10-2003
			CN	1446371 A	01-10-2003
			EP	1312103 A2	21-05-2003
			EP	1312104 A2	21-05-2003
			EP	1309847 A1	14-05-2003
			JP	2004506228 T	26-02-2004
			JP	2004511001 T	08-04-2004
			JP	2004511002 T	08-04-2004
			WO	0212857 A1	14-02-2002
			WO	0213224 A2	14-02-2002
			WO	0212404 A2	14-02-2002
			US	2003012936 A1	16-01-2003
			US	2004081764 A1	29-04-2004
			US	2002114934 A1	22-08-2002
			US	2002122925 A1	05-09-2002
US 4853262	A	01-08-1989	JP	1814392 C	18-01-1994
			JP	5019684 B	17-03-1993
			JP	62038408 A	19-02-1987
US 3498860	A	03-03-1970	NONE		
US 4302480	A	24-11-1981	DE	2826363 A1	20-12-1979
			BE	876970 A2	14-12-1979
			BR	7903793 A	05-02-1980
			CH	641726 A5	15-03-1984
			FR	2428853 A1	11-01-1980
			GB	2023871 A ,B	03-01-1980
			IT	1117185 B	17-02-1986
			JP	55002988 A	10-01-1980
			NL	7904721 A	18-12-1979
			SE	7905297 A	17-12-1979
JP 61254916	A	12-11-1986	NONE		
JP 2001125006	A	11-05-2001	WO	0133279 A1	10-05-2001

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/000982

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N1/28 G01N1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 589 650 B1 (GOVEK MICHAEL ET AL) 8. Juli 2003 (2003-07-08) Zusammenfassung Spalten 2-4 Spalte 5, Zeilen 45-60 Spalte 7, Zeilen 28-60 ----- US 4 853 262 A (HORIE ET AL) 1. August 1989 (1989-08-01) Spalte 2, Zeilen 1-25 Spalte 2, Zeilen 67,68 Spalte 3, Zeilen 46-49 Spalte 3, Zeilen 57-69 Beispiel 1 ----- -/-	1-9
X		1-9

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

3. Mai 2005

13/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL – 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Michalitsch, R

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/000982

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 3 498 860 A (JOHN E.P. PICKETT) 3. März 1970 (1970-03-03) Spalte 1, Zeile 63 – Spalte 2, Zeile 15 Spalte 2, Zeilen 58-61 -----	1-9
X	US 4 302 480 A (FISCHER ET AL) 24. November 1981 (1981-11-24) Zusammenfassung Spalte 1, Zeilen 40-54 Spalte 3, Zeilen 1-56 -----	1-9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 011, Nr. 107 (P-563), 4. April 1987 (1987-04-04) & JP 61 254916 A (MITSUBISHI RAYON CO LTD), 12. November 1986 (1986-11-12) Zusammenfassung -----	1-9
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 2000, Nr. 22, 9. März 2001 (2001-03-09) & JP 2001 125006 A (MUTO KAGAKU KK), 11. Mai 2001 (2001-05-11) Zusammenfassung -----	1-9

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationales Aktenzeichen  
**PCT/EP2005/000982**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6589650	B1	08-07-2003		AU 2939501 A AU 8114101 A AU 8120201 A CN 1446370 A CN 1446371 A EP 1312103 A2 EP 1312104 A2 EP 1309847 A1 JP 2004506228 T JP 2004511001 T JP 2004511002 T WO 0212857 A1 WO 0213224 A2 WO 0212404 A2 US 2003012936 A1 US 2004081764 A1 US 2002114934 A1 US 2002122925 A1		18-02-2002 18-02-2002 18-02-2002 01-10-2003 01-10-2003 21-05-2003 21-05-2003 14-05-2003 26-02-2004 08-04-2004 08-04-2004 14-02-2002 14-02-2002 14-02-2002 16-01-2003 29-04-2004 22-08-2002 05-09-2002
US 4853262	A	01-08-1989		JP 1814392 C JP 5019684 B JP 62038408 A		18-01-1994 17-03-1993 19-02-1987
US 3498860	A	03-03-1970		KEINE		
US 4302480	A	24-11-1981		DE 2826363 A1 BE 876970 A2 BR 7903793 A CH 641726 A5 FR 2428853 A1 GB 2023871 A ,B IT 1117185 B JP 55002988 A NL 7904721 A SE 7905297 A		20-12-1979 14-12-1979 05-02-1980 15-03-1984 11-01-1980 03-01-1980 17-02-1986 10-01-1980 18-12-1979 17-12-1979
JP 61254916	A	12-11-1986		KEINE		
JP 2001125006	A	11-05-2001	WO	0133279 A1		10-05-2001